

# ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Н.П. Дробат, А.Л. Рудой,  
Т.М. Ермоленко, Т.В. Трухачева

## РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА СЕВИТИН (КАПЛИ ГЛАЗНЫЕ И НАЗАЛЬНЫЕ)

РУП «Белмедпрепараты», г. Минск

*В работе приведены результаты исследований по разработке методик контроля качества нового лекарственного средства Севитин (карнозин) - капли глазные и назальные. Для контроля качества готовой лекарственной формы разработаны методики с использованием методов высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографии. Предложенные методики позволяют наряду с идентификацией лекарственного средства осуществлять количественное определение активного вещества (L-карнозина) и консерванта (бензалкония хлорид) и обнаруживать сопутствующие посторонние примеси с высокой степенью точности.*

**Ключевые слова:** Севитин, контроль качества, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография.

### ВВЕДЕНИЕ

Антиоксидантная терапия стала неотъемлемой частью офтальмологической практики, в том числе в лечении вирусных, бактериальных и метаболических заболеваний роговицы, в лечении глаукомы, заболеваний хрусталика и сетчатки, при травме глаза. В настоящее время с этой целью применяют витамин А или бета-каротин, витамин С (аскорбиновая кислота), витамин Е (альфа-токоферол), тауфон, эмоксипин, а также L-карнозин. L-карнозин занимает важное место среди антиоксидантных средств и с успехом применяется в лечении широкого ряда заболеваний в офтальмологии.

L-карнозин является биологически активным дипептидом, в состав которого входят две аминокислоты - гистидин и  $\beta$ -аланин.

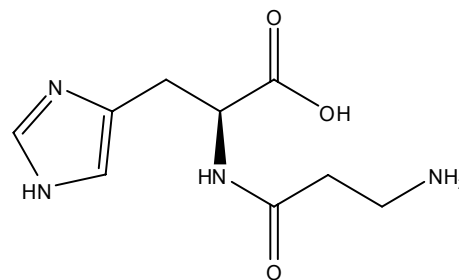
Карнозин влияет на метаболические процессы: гликолиз, окислительное фосфорилирование. Механизм действия карнозина обусловлен антиоксидантным и мембранопротекторным действием. Карнозин ингибирует перекисное окисление липидов, усиливает антиоксидантную защиту, повышает устойчивость организма к воздействию различных патологических факторов при кислородозависимых состояниях [1].

В многочисленных клинических исследованиях продемонстрирована высокая эффективность лекарственного средства Севитин, представляющего собой 5% раствор L-карнозина, при язвенном кератите, кератопатии различной этиологии, метаболических заболеваниях тканей роговицы, сезонном аллергическом риноконъюнктивите, а также при сезонном аллергическом рините [2-5].

Целью настоящей работы являлась разработка и валидация методик контроля качества лекарственного средства Севитин (капли глазные и назальные) производства РУП «Белмедпрепараты».

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе была использована синтетическая субстанция N- $\alpha$ -(3-аминопропионил)-(S)-гистидин (L-карнозин):



Содержание активного вещества в субстанции составляет не менее 99%, примеси:  $\beta$ -аланин – не более 0,1%, гистидин –

не более 1,0 %. Субстанция L-карнозина закупается непосредственно у производителя - японской компании Namarí Chemicals, LTD. Использование синтетического дипептида, наряду с высокой степенью чистоты исходной субстанции, имеет еще и то преимущество, что исключает риск заражения потребителей лекарственного средства прионовыми болезнями. Субстанция L-карнозин производства компании Namarí Chemicals, LTD зарегистрирована в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь с 2004 года (НД РБ 0259С-2008).

В состав лекарственного средства кроме L-карнозина, в концентрации 50 мг/мл, входит натрия хлорид (НД РБ 0051С-2009), который обеспечивает изотоничность раствора, в качестве консерванта используется бензалкония хлорид (Государственная фармакопея Республики Беларусь, том 2, с. 83) в концентрации 0,08 мг/мл.

Разработка методик осуществлялась на опытных сериях лекарственного средства Севитин.

Количественное содержание L-карнозина и бензалкония хлорида определялось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе "Shimadzu" с УФ-детектором (модель SPD-10AVP, от 190 до 600 нм), автосамплером с охлаждением (модель SIL- 10AF) и двухканальным насосом (модель LC-10ATVP). Определение L-карнозина проводилось на хроматографической колонке 125x4,0 мм - "LiChrospher 100 RP-18e" 5 мкм ("Merck", Германия), бензалкония хлорида - на хроматографической колонке 250x4,6 мм - "Hypersil GOLD CN" ("Teramo", Великобритания).

Для обнаружения посторонних примесей сопутствующих аминокислот (гистидин и β-аланин) в лекарственном средстве был использован метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием для анализа пластин Silica gel 60 фирмы Merck и смеси растворителей: н-пропиловый спирт - аммиак водный - вода (7:2:1) в присутствии стандартных образцов β-аланина и гистидина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Важнейшей задачей проводимых исследований являлась разработка эффективных и воспроизводимых методик контроля основных показателей качества лекарственного средства: определение посторонних примесей (β-аланин и гистидин), количественное определение активного вещества (L-карнозин) и консерванта (бензалкония хлорид).

Для определения количественного содержания L-карнозина в лекарственном средстве Севитин использован метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Незащищенные пептиды – полярные соединения, их разделение на силикагеле сопряжено со значительными трудностями. Молекула L-карнозина несет полный электрический заряд (содержит свободные карбоксильную и аминогруппы) и соответственно слабо удерживается на обращенно-фазовых колонках. С целью увеличения удерживающей способности сорбента, в соответствии с литературными данными [6], использован принцип влияния сдвига вторичных равновесий, например, изменения pH и образование ионных пар, на разрешающую способность обращенно-фазовых колонок. Показано [6], что для разделения пептидов наиболее предпочтительны методики, в которых гидрофобные или гидрофильные противоионы добавляются к элюенту при низких значениях pH. В качестве ион-парного гидрофобного реагента нами была использована трифторуксусная кислота (ТФУ).

Количественное определение L-карнозина проводилось на колонке, заполненной сорбентом силикагель октадецилсилильный, с подвижной фазой 0,1% раствор ТФУ в воде при скорости элюирования 1,0 мл/мин и детектировании при длине волны 220 нм. В этих условиях хроматографирования был получен пик карнозина, удовлетворяющий требованиям Государственной Фармакопеи Республики Беларусь (рис. 1) по параметрам: асимметрия пика - 1,12; число теоретических тарелок - 2200.

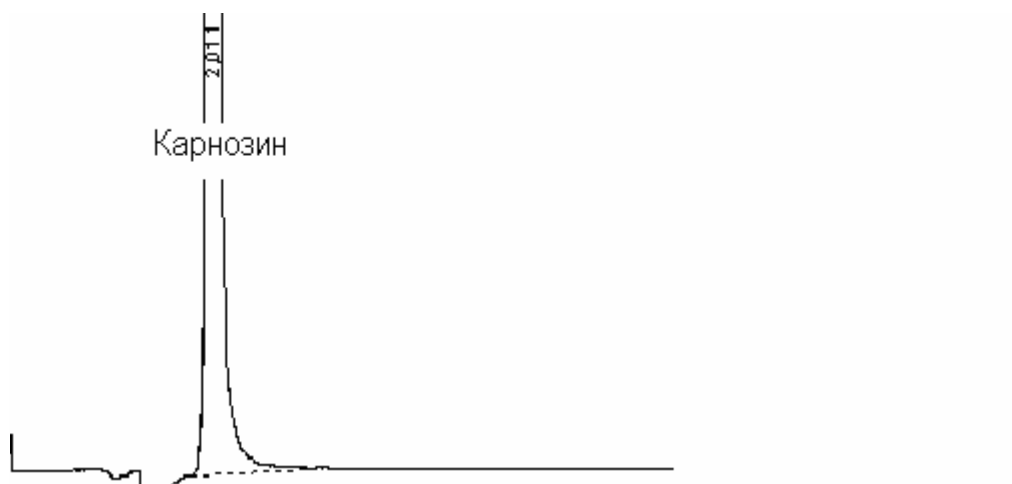


Рис. 1. Хроматограмма лекарственного средства Севитин

Разработанная методика ВЭЖХ количественного определения L-карнозина провалидирована. Проведенные валидационные испытания подтвердили правильность, точность и воспроизводимость результатов, получаемых при определении количественного содержания карнозина в лекарственном средстве Севитин.

Метод ВЭЖХ использован также для разработки методики количественного определения содержания в лекарственном средстве консерванта бензалкония хлорида. Анализ проводился на хроматографической колонке, заполненной сорбентом силикагель цианосилильный, подвижная фаза фосфатный буферный раствор pH 2,3 – ацетонитрил (55-45), скорость элюирования –

1,5 мл/мин, детектирование при длине волны 214 нм. Использование специально предназначенной для количественного определения бензалкония хлорида хроматографической колонки и экспериментально подобранные условия проведения хроматографии позволяют осуществлять определение содержания бензалкония хлорида за короткий промежуток времени с достаточно высокой степенью точности (рис. 2). Значение относительного стандартного отклонения, рассчитанного для площади пика бензалкония хлорида из 10 определений, составляет менее 7 %, что соответствует требованиям Государственной фармакопеи Республики Беларусь.

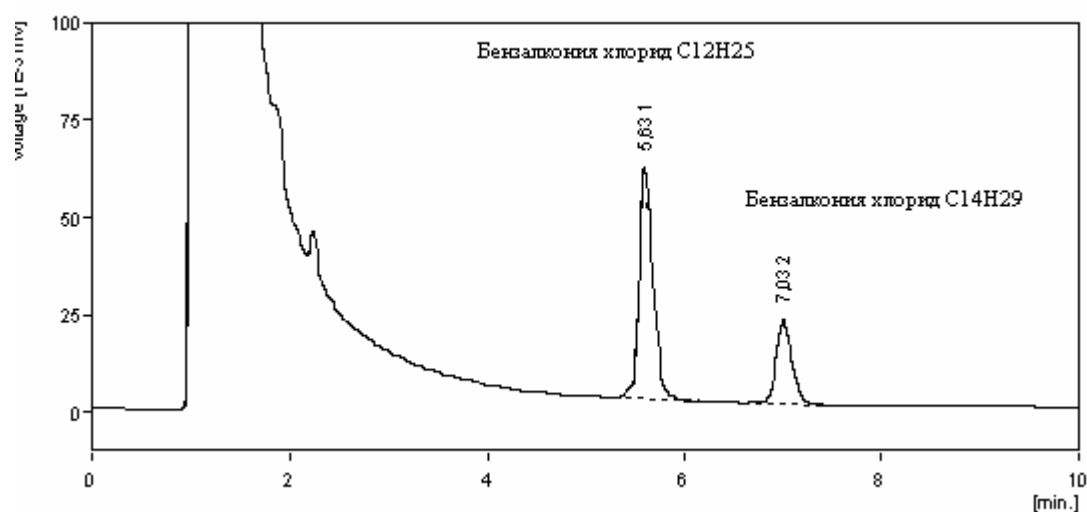
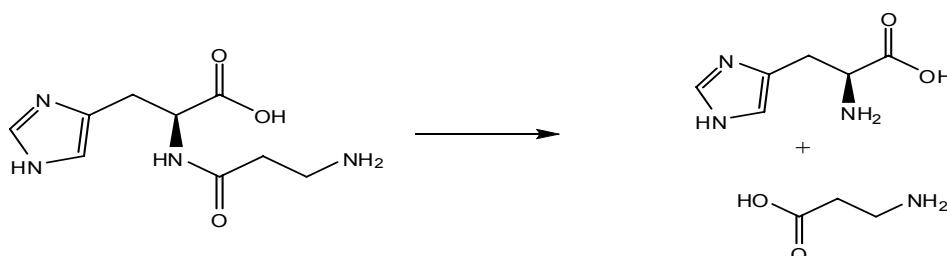


Рис. 2. Хроматограмма бензалкония хлорида в лекарственном средстве Севитин

L – карнозин – синтетический дипептид, в состав молекулы которого входят две аминокислоты (гистидин и β-аланин). Химическая структура его подтверждается при проведении анализа рас-

твора лекарственного средства, подвергнувшегося химическому гидролизу по пептидной связи 6 М кислотой хлористоводородной (см. рис.4).



Гистидин и β-аланин являются не только исходными веществами, из которых осуществляется синтез L – карнозина, но и основными продуктами (примеси), которые образуются в процессе хранения лекарственного средства.

Метод ВЭЖХ для оценки содержания примесей гистидина и β-аланина в лекарственном средстве Севитин, без предварительного их превращения в производные с хромофор-активными заместителями, не обладает достаточной чувстви-

тельностью [6]. На рис. 3 приведена хроматограмма модельной смеси, где концентрация гистидина составляет 10% от концентрации L-карнозина. Если же гистидин или β-аланин находятся в смеси в количествах по 1%, то соответствующие им пики на хроматограмме отсутствуют. Увеличение концентрации L-карнозина в пробе приводит к нарушению параметров асимметрии пика основного вещества, а гистидин и β-аланин имеют одинаковое время выхода и на хроматограмме не разделяются.

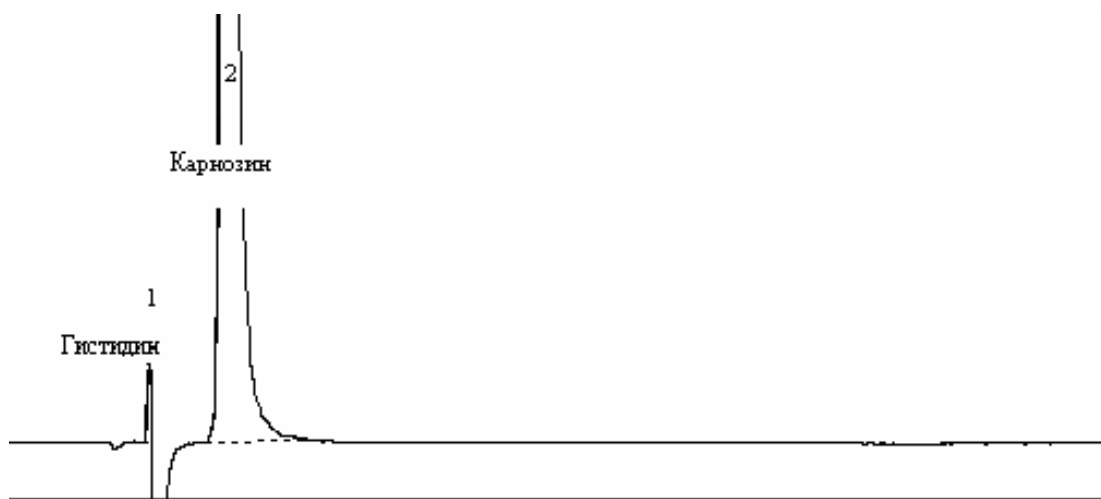


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси карнозина и гистидина (10%)

Для количественного определения посторонних примесей сопутствующих аминокислот (гистидин и β-аланин) в ле-

карственном средстве был применен метод ТСХ (рис. 4).

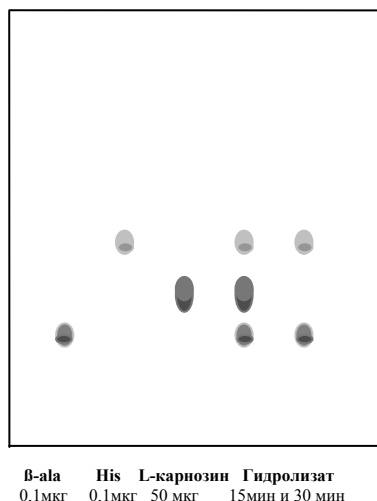


Рис. 4. Хроматограмма L-карнозина и его гидролизата (метод ТСХ)

Использование нингидринового реактива для обнаружения и проявления на пластинах ТСХ аминокислот и пептидов позволяет выявлять их в исследуемых образцах в следовых количествах [6]. На основании литературных данных [6] была выбрана и апробирована разделительная хроматографическая система, позволяющая четко разделять на ТСХ пластинке пятна L-карнозина, β-аланина и гистидина. При нанесении на хроматографическую пластинку гистидина или β-аланина в количествах 0,05 мкг наблюдаются четкие пятна аминокислот. Таким образом, при нанесении пробы лекарственного средства массой 50 мкг могут быть обнаружены примеси сопутствующих аминокислот, составляющие 0,1-0,2% (рис. 4).

Таким образом, в результате проведенных исследований были разработаны современные, эффективные и высокоточные методики для проведения аналитического контроля по основным показателям качества лекарственного средства Севитин.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработанные методики: ВЭЖХ для количественного определения L-карнозина и бензалкония хлорида и ТСХ – для контроля примесей, включены в Фармакопейную статью (ВФС РБ 0861-04) на лекарственное средство Севитин (капли глазные и назальные) производства РУП «Белмедпрепараты».

2. При проведении валидации методики количественного определения L-карнозина и бензалкония хлорида методом ВЭЖХ получены результаты, удовлетворяющие критериям приемлемости и позволяющие сделать вывод, что методики воспроизводимы, правильны и точны.

С 2007 года РУП «Белмедпрепараты» осуществляется производство лекарственного средства Севитин во флаконах по 5 мл и тубик-капельницах по 1 мл.

### SUMMARY

N.P. Drobat, A.L. Rudoi,  
T.M. Ermolenko, T.V. Trukhachova  
DEVELOPMENT OF ANALYTICAL  
ESTIMATE METHODS OF THE  
PREPARATION SEVITIN  
(EYE DROPS AND FOR NOSE)

In this work the results of researches on development of the techniques of quality assurance of the new medicine Sevitin (eye drops and for nose) are given. The techniques of quality assurance of the finished product were developed by high-performance liquid (HPLC) and thin-layer chromatography (TLC) methods. The offered techniques allow along with preparation identification, to carry out quantitative definition of active substance (L-carnosine) and preservative (benzalkonium chloride) and to find out related substances with high degree of accuracy.

Key words: Sevitin, quality assurance, high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography.

### ЛИТЕРАТУРА

1. The antioxydative properties of carnosine, anatural histidine-containing dipeptide. Biochem.intern / A.A. Boldyrev [et al.]. – 1987. – Vol. 15. – P. 1105-1113.
2. Федоров. С.Н. Новый подход к оценке влияния ультразвуковой факоэмульсификации на структуры глаза и выборе протекторов / С.Н.Федоров // Офтальмохирургия. – 1999. – № 2. – С. 51-58.
3. Майчук, Ю.Ф. Стромальная дистрофия роговицы: клинические формы и лечение /

- Ю.Ф. Майчук, Л.Е. Орловская // Офтальм. журнал. – 1993. – №4. – С. 224–234.
4. Майчук, Ю.Ф. Разработка глазных капель карнозина и оценка их эффективности при заболеваниях роговицы / Ю.Ф. Майчук, В.Е. Формазюк, В.И. Сергиенко // Вестник офтальмологии. – 1997. – Т. 113. – № 6. – С. 27–31.
5. Эффективность применения капель карнозина в терапии заболеваний и при эксимерлазерной хирургии роговицы / Ю.Ф. Майчук [и др.] // Офтальмол. журн.. – 2000. – №4. – С.24–25.
6. Хефтман, Э. Хроматография. Практическое приложение метода (в 2-х томах) / Э. Хефтман. – Москва: “Мир”. – 1986. – Т. 1. – С. 305–307.

**Адрес для корреспонденции:**

220007, Республика Беларусь,  
РУП «Белмедпрепараты»,  
г. Минск, ул. Фабрициуса, 30,  
тел./факс ) (017) 220 37 16, 220 31 42,  
e-mail: [medic@belmedpreparaty.com](mailto:medic@belmedpreparaty.com),  
[nfc@belmedpreparaty.com](mailto:nfc@belmedpreparaty.com)

Дробат Н.П.

Поступила 12.05.2009 г.

\*\*\*\*\*

**Д.В. Моисеев, В.М. Ершик, В.И. Фадеев,  
М.Л. Пивовар, А.Д. Кочуев,  
А.И. Жебентяев, Н.Д. Яранцева**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИМЕТАЗИДИНА В  
ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ  
СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ  
ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Витебский государственный  
медицинский университет

*Разработана простая методика определения триметазидина в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением УФ-детектора. Триметазидин и внутренний стандарт (новокаин) экстрагировали из пробы плазмы толуолом. После упаривания толуола органический остаток растворяли в подвижной фазе*

*и вводили в хроматографическую колонку. Исследуемые вещества элюировали смесью ацетонитрил: фосфатный буфер (рН=2,5) в градиентном режиме. Расход подвижной фазы составляет 1,0 мл/мин. Детектирование осуществлялось при длине волны 210 нм. Предел обнаружения составляет 1,0 нг/мл (при соотношении сигнал/шум=3:1), предел количественного определения составляет 3,5 нг/мл. Степень экстракции составляет 56 %. Градуировочный график линейен в диапазоне концентраций 3,5 – 139,8 нг/мл.*

**Ключевые слова:** триметазидин, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ- детектор.

**ВВЕДЕНИЕ**

Триметазидин (1-(2,3,4-триметоксибензил)-пиперазин) (рис. 1) применяется как антиангинальное, антигипоксическое, цитопротективное и метаболическое лекарственное средство (ЛС). Выпускается в виде таблеток, покрытых оболочкой, по 20 и 35 мг [1]. Оригинальное лекарственное средство Предуктал МВ (Франция). Кроме данного ЛС, на фармацевтическом рынке стран СНГ присутствуют и генерики (Триметазид, Медарум). В Республике Беларусь, в соответствии с государственной программой импортозамещения ЛС, планируется производство генерических лекарственных средств триметазидина. Одним из условий для регистрации и успешного производства ЛС является проведение биоэквивалентных испытаний. Поэтому актуальной задачей является разработка и валидация методики определения триметазидина в плазме крови.

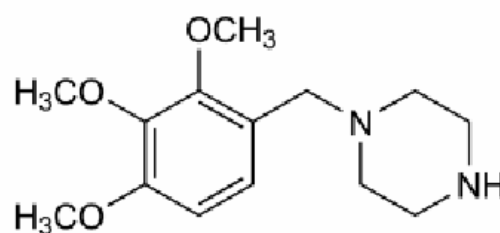


Рис. 1. Структурная формула триметазидина